対象化合物保護剤を使用する場合と使用しない場合の有機リン系 (OP) 農薬に対する Agilent J&W DB-35ms UI カラムを使用したウルトライナート (UI) ウールライナの性能

アプリケーションノート

食品安全性

著者

Ken Lynam、Doris Smith

Agilent Technologies, Inc.

2850 Centerville Road

Wilmington, Delaware 19808

USA

概要

ウール入りのライナは、ウールにおける活性点が分析対象成分の吸着の原因になることがあるため、これまで農薬分析には避けられてきました。Agilent J&W DB-35ms UI カラムと組み合わせて Agilent ウルトライナート (UI) ウールライナを使用すると、対象化合物保護剤の有無にかかわらずオリーブオイルマトリクスで有機リン系 (OP) 農薬を効果的に分析できます。

はじめに

有機リン系 (OP) 農薬などのクロマトグラフィ的に活性のある化合物は、サンプル流路の活性点に吸着し、分析対象成分のレスポンスを低下させ、極端なケースでは微量のシグナルが検出されない原因になります。また、これらの農薬は、クロマトグラフィシステムの活性面との相互作用により、ピークテーリングを発生させる傾向があります。OP 農薬で一貫性のある結果を達成するためには、流路全体の表面活性度を最小限に抑えることが不可欠です [1]。メタミドホス、アセフェート、オメトエート、およびジメトエートは、これらの構造の P=O 結合により特に分析が難しい化合物です。これらの対象成分がこの分析のターゲットです。

サンプル流路における活性点は、主に GC 注入口内にあります。残留分析では、混合物サンプルを繰り返し注入すると、不揮発性マトリクス成分が注入口ライナとカラムヘッドに徐々に蓄積して活性面を生成し、メンテナンスの必要性が生じることがあります。このマトリクスが引き起こす効果は、ピーク形状、レスポンス、およびリテンションに影響する場合があります。アジレントのウール入りウルトライナートライナは、不活性ウールで不揮発性物質をトラップすることにより、活性を最小限に押さえ、注入口とカラムヘッドにマトリクス成分が蓄積するのを防ぎます [2]。

Agilent Technologies

GC カラムも活性点になる可能性があります。カラムは、注入口ライナに比べて大きな表面積を持っているため、ピーク形状の不具合や吸着につながる表面活性を最小限に抑えることが不可欠です。アジレントの J&W DB-35ms ウルトライナート (UI) カラムは、要求の厳しいテストプローブを使用した厳格な評価を通じて、一貫性のある不活性性能を最大限発揮するように不活性度が検証されています [3、4]。

これらの農薬を分析する前に、流路の活性を排除するあらゆる手段を講じる必要があります。新しいゴールドシールと、ウルトライナート注入口ライナを使用して注入口のメンテナンスを実施することをお勧めします。また、不活性性能が検証されたウルトライナートカラムを取り付けることもできます。注入パラメータを最適化して、クロマトグラフィシステム全体から可能な限り最高の結果を得る必要があります。

流路の活性を排除するための手段をすべて実施した後、サンプルマトリクス中の残留農薬の分析時に考慮すべき項目として、マトリクス効果があります。この効果は、マトリクスありとマトリクスなしの状態で注入したときに、影響を受ける分析対象成分のピーク形状とシグナルが変化することからわかります。これは、マトリクスが活性点の保護剤として機能するためと思われます。P=O 結合を含むメタミドホス、アセフェート、オメトエートなどの OP 農薬は、このマトリクス効果の恩恵を受けることが多く、マトリクスのない標準試料よりもマトリクス中の分析対象成分に対して高いレスポンスを生成するため、サンプル回収率の結果が不正確になる可能性があります。

Anastassiades のグループは、マトリクス効果による分析結果の誤りを最小限に抑えるのに役立つ対象化合物保護剤の使用を提案しました [5]。これらの対象化合物保護剤 (AP) は、影響を受けやすい分析対象成分を保護するためにマトリクス抽出物に添加できる化合物です。Anastassiades のグループによるその後の研究で、さまざまな化合物が有効な AP として評価されました [6]。その評価に基づき、今回の研究では L-グロン酸 γ-ラクトン (グロノラクトン) を対象化合物保護剤として選択しました。ここでは、4 つの農薬含有 P=O 結合に対してウール入りウルトライナート (UI) ライナおよび DB-35ms UI カラムと共に対象化合物保護剤を使用する利点の検証に焦点を絞りました。

実験

炎光光度検出器と Agilent 7683B オートサンプラを搭載した Agilent 7890 GC/5975C MSD を、この一連の実験に使用しました。パージ付き 2 ウェイキャピラリフローテクノロジ (CFT) デバイスを使用して、流路を 1:1 で MSD:FPD に分割しました。CFT デバイスでは、ポストカラムバックフラッシュも使用しました [7]。表 1 に、これらの分析に使用したクロマトグラフィ条件を示します。表 2 に、これらの実験で使用した各種消耗品を示します。

表 1. クロマトグラフィ条件

GC/MSD	Agilent 7890/5975C
サンプラ	Agilent 7683B、5.0 µL シリンジ (P/N 5181-1273)
CFT デバイス	パージ付き 2 ウェイスプリッタ (P/N G3180B)
スプリット比	1:1 MSD:FPD
MSD リストリクタ	1.43 m x 0.18 mm ID 不活性化処理済みフューズドシリカチューブ (P/N 160-2615-10)
FPD リストリクタ	0.53 m x 0.18 mm ID 不活性化処理済みフューズドシリカチューブ (P/N 160-2615-10)
Aux EPC	3.8 psi 定圧
注入口	2 µL スプリットレス。250 °C、パージ流量 60 mL/min (0.25 分)、ガスセーバ 20 mL/min (2 分)
カラム	DB-35ms UI 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (P/N 122-3832UI)
キャリア	ヘリウム、定圧 28.85 psi (95 °C)
オーブン	95 °C (0.5 分間)、25 °C/min で 95～210 °C、10 °C/min で 210～250 °C (0.5 分間)、20 °C/min で 250～290 °C (4.5 分間)
ポストランバックフラッシュ	290 °C で 8.75 分、バックフラッシュ中の Aux EPC 圧力 45 psi、バックフラッシュ中の注入口圧力 2 psi
MSD	トランスファライン 300 °C、イオン源 300 °C、四重極 150 °C
FPD	230 °C、水素 75 mL/min、空気 100 mL/min、キャリアガス + メークアップガス (N2) 60mL/min

表 2. 使用した消耗品

バイアルとキャップ	クリンプトップ茶色 MS 分析バイアルキット (P/N 5190-2283)
バイアルインサート	250 µL ガラス/樹脂脚 (P/N 5181-8872)
シリンジ	5 µL (P/N 5181-1273)
セプタム	高性能グリーン (P/N 5183-4759)
注入口ライナ	ウール入りウルトライナートシングルテーパライナ (P/N 5190-2293)
フェラル	0.4 mm ID ショート。85/15 ベスペル/グラファイト (P/N 5181-3323)
PCT フィッティング	内部ナット (P/N G2855-20530)
PCT フェラル	SilTite フェラル、0.25 mm ID (P/N 5188-5361)
20 倍ルーペ	20 倍拡大ルーペ (P/N 430-1020)

試薬と標準試料

すべての試薬および溶媒は HPLC または Ultra Resi グレードでした。Honeywell (米国ミシガン州マスキーゴン) のアセトニトリル (ACN)、Burdick & Jackson のトルエン、および JT Baker のアセトンを、VWR International (米国ペンシルベニア州ウェストチェスター) を通じて購入しました。農薬標準試料は Chem Service, Inc. (米国ペンシルベニア州ウェストチェスター) から、グロノラクトンは Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から、リン酸トリフェニルは Alfa Aesar (マサチューセッツ州ワードヒル) から購入しました。

溶液と標準試料

個々の OP 農薬標準試料をアセトンで前処理して、1〜2 mg/mL の濃度の溶液を生成しました。これらの溶液を使用して、アセトンで 50 µg/mL 標準溶液を作成し、さらに 1 および 5 µg/mL の濃度のスパイク溶液を準備しました。サロゲート標準のリン酸トリフェニル (TPP) は、トルエン中に 1、15、および 100 µg/mL の濃度で作成しました。対象化合物保護剤溶液は、グロノラクトンを最小量の水と適切な量の ACN に溶解して 50 mg/mL の濃度で準備しました。農薬とサロゲート標準スパイク溶液を使用して、マトリクスブランク抽出物中のマトリクス標準試料を適切に希釈することで前処理しました。適切な量のグロノラクトン溶液をキャリブレーション標準試料に添加して、各標準試料に 0.5 mg/mL の濃度を生成しました。

サンプル前処理

エキストラバージンオリーブオイルのサンプルは地元の食料品店から購入しました。サンプル抽出メソッドでは、修正を加えた QuEChERS 法を利用しました。図 1 に、サンプル前処理手順をフローチャートで示します。

3.00 (± 0.05) g のオリーブオイルを含むサンプルを計量して遠心分離チューブに入れ、2 本のセラミック製バー (P/N 5982-9313) を各サンプルに入れて、サンプル抽出を促進しました。各サンプルに試薬グレードの低温水 7 mL を加え、1 分間攪拌しました。その後 ACN 10 mL をチューブに入れ、サンプルを 1 分間攪拌し、4 グラムの $MgSO_4$ と 1 g の塩化ナトリウムを含むアジレントオリジナルの QuEChERS 抽出塩パッケージ (P/N 5982-5550) を各遠心分離チューブに加えました。キャップを閉めたチューブを 1 分間 1500 rpm で振り混ぜ、その後サンプルを 4000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

8 mL の上部層アリコートを、脂質が多いサンプル用の Agilent QuEChERS AOAC 分散 SPE 15 mL チューブ (P/N 5982-5158) に移しました。1 分間攪拌してから、4000 rpm で 5 分間遠心分離しました。約 5.5 mL の抽出物を、2 本目の脂質が多いサンプル用分散 SPE 15 mL チューブに移し、上記の攪拌と遠心分離手順を繰り返してサンプル抽出を完了しました。2 本目の dSPE チューブからの抽出物を集め、適切な量の農薬とサロゲート標準スパイク溶液を添加して、マトリクスブランク抽出物のマトリクス標準試料を前処理しました。グロノラクトン溶液を添加して 0.5 mg/mL のグロノラクトンを生成しました。

表 1 に示すクロマトグラフィ条件を使用して、抽出物を GC/MS/FPD で分析しました。

QuEChERS サンプル前処理ワークフロー

結果と考察

GC/MS/FPD システムおよび同一の DB-35ms UI カラムで 100 回繰り返し注入するために、大量のオリーブオイルサンプルマトリクスを準備しました。250 ng/mL マトリクス標準試料の注入を 100 回実行することで Agilent ウール入りウルトライナートライナの性能を評価しました。10 回のマトリクス注入が終わるたびに溶媒ブランクを分析しました。最初のセットの分析は、対象化合物保護剤を使用せずに UI ウール入りライナを使用して行いました。2 番目の注入セットでは、カラムのヘッドをトリミングし、新しいゴールドシール、セプタム、ウール入り UI ライナ、および O リングに交換し、対象化合物保護剤としてグロノラクトンをマトリクス標準試料に添加しました。メタミドホス、アセフェート、オメトエート、およびジメトエートの結果を慎重に検証して、UI ウールライナの性能と GC/MS/FPD システムにおける対象化合物保護剤の影響を評価しました。

図 2 に、Agilent ウール入りウルトライナートライナでの 1 回目、50 回目、および 100 回目の注入の後で観察された QuEChERS マトリクスのピーク形状を示します。メタミドホス、アセフェート、オメトエート、およびジメトエートの一連の分析で、シグナル強度とピーク形状は高い再現性を示しています。4 つの対象 OP 農薬すべてについて、100 回のマトリクス注入で RSD が 9 % 未満という良好な再現性が達成されました。表 3 に、10 回、50 回、および 100 回の注入後の各農薬の %RSD 値を示します。シグナル強度、ピーク形状、および面積の一貫した再現性は、QuEChERS マトリクスサンプルの 100 回以上の分析にウール入りウルトライナートライナを使用しても問題はなく、吸着など分析する上で問題の多い有機リン系農薬を効果的に検出できることを示しています。

アジレントのウール入りウルトライナートライナを使用した、有機農薬の 100 回以上の注入

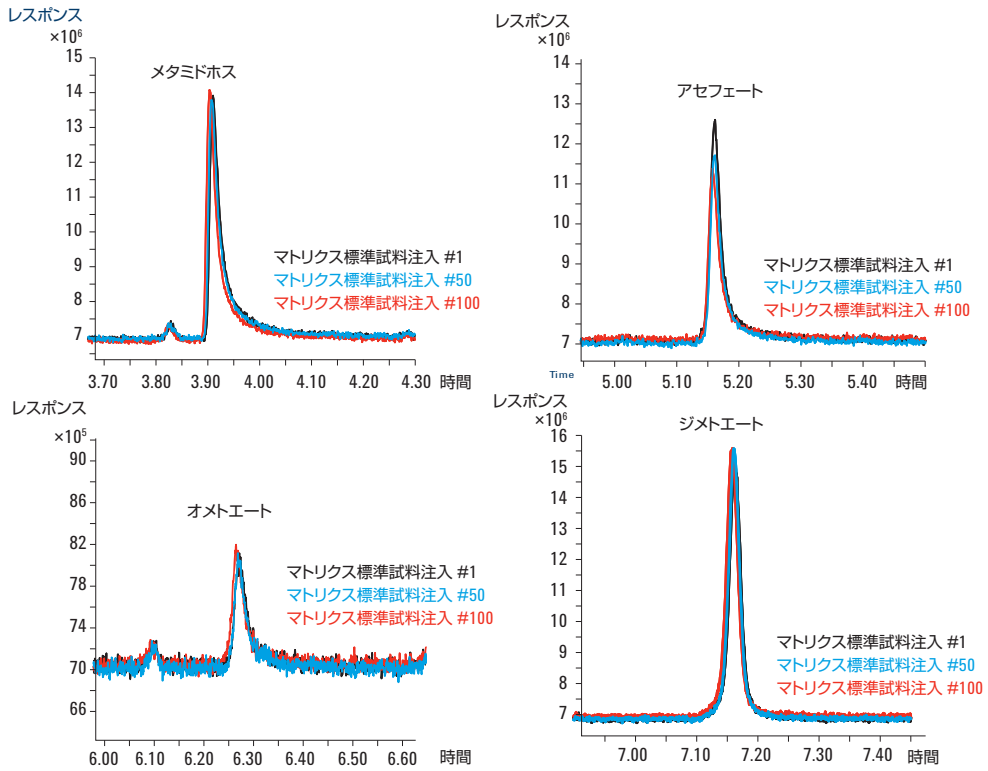

図 2. 対象化合物保護剤を使用しない UI ウールライナでの OP 農薬の 1 回目、50 回目、100 回目の注入の重ね書き

アジレントのウール入りウルトライナートライナの再現性 (%RSD)

表 3. アジレントのウール入りウルトライナートライナを使用した、対象化合物保護剤を使用しない 250 ng/mL マトリクス標準試料の 100 回を超える注入の再現性

農薬	%RSD 10 回注入	50 回注入	100 回注入
メタミドホス	2.6	2.6	3.9
アセフェート	2.2	4.6	8.7
オメトエート	3.8	4.1	4.6
ジメトエート	2.9	2.7	2.7

図 3 に、対象化合物保護剤を使用する場合と使用しない場合の、UI ウールライナでの 100 回のマトリクス注入後の標準試料のレスポンスを示します。この図は、対象化合物保護剤を使用した場合に、分析の難しい OP 農薬のほとんどについてシグナルレスポンスが向上していることを示しています。ジメトエートのシグナルレスポンスは、対象化合物保護剤を使用するとわずかに向上しました。シグナルレスポンスの向上は、アセフェートとオメトエートでは 40 % 台、メタミドホスでは 20 % 台、ジメトエートでは 8 % でした。対象化合物保護剤を使用すると、主にアセフェート、オメトエート、およびメタミドホスのピーク形状が向上しました。図 3 に示した 100 回の注入後のピークテーリングファクタは、多数のマトリクスサンプルの後に蓄積する可能性のある流路の潜在的な活性面のマスキングに対象化合物保護剤が与える効果を示しています。

対象化合物保護剤を使用する場合と使用しない場合のピーク形状とレスポンスの比較

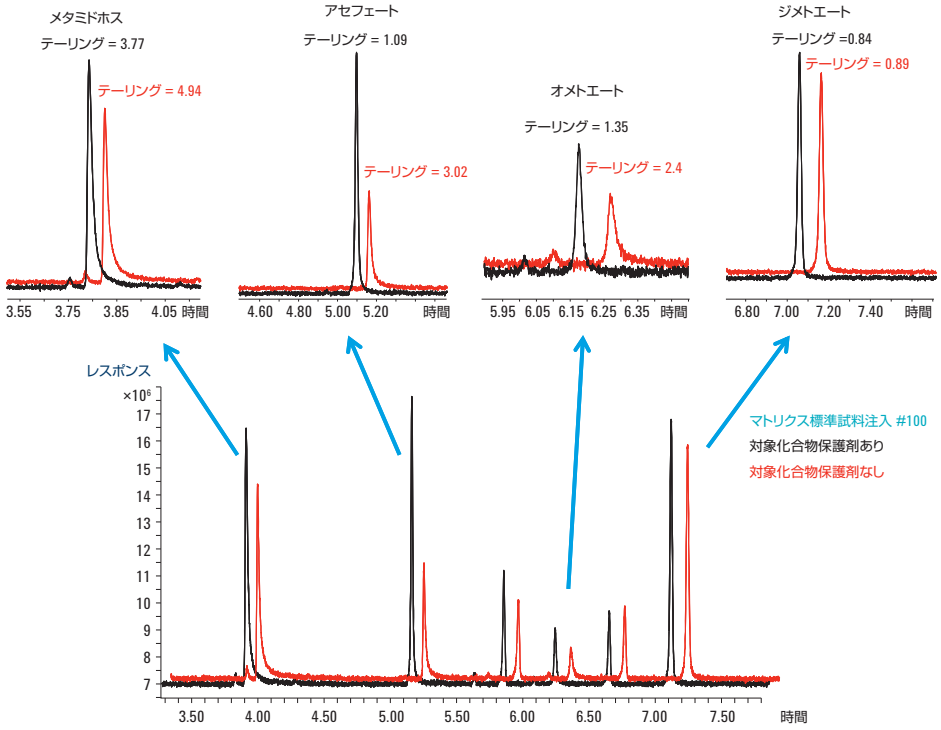

図 3. UI ウールライナを使用した、対象化合物保護剤を使用する場合と使用しない場合の問題の多い OP 農薬のリテンションタイムをオフセットした 100 回目の注入のクロマトグラムの重ね書き

結論

これらの結果は、アジレントのウール入りウルトライナートライナの使用が、少なくとも 100 回のオリーブオイル QuECHeRS マトリクス注入においても、有機リン系農薬に対して効果的であることを明確に示しています。分析が難しい有機リン系農薬 250 ppb レベルでの 1 回目、50 回目、および 100 回目の注入で、シグナルレスポンスとピーク形状に関して一貫性のある結果が見られました。この結果は、最終マトリクス抽出物に対象化合物保護剤のグロノラクトンを添加した場合と添加しない場合の両方で見られました。観測された一貫性は、分析中にこれらのウルトライナートライナのウールの影響による農薬の損失がなかったことを示しています。

グロノラクトン対象化合物保護剤の添加により、アセフェートとオメトエートの面積レスポンスとピーク形状が向上しました。メタミドホスとジメトエートでもピーク形状とシグナルの向上が見られましたが、それほど劇的ではありませんでした。有機リン系農薬を含有する分析の難しいこれらの P=O 結合に対して一貫性のある正確な結果を得るには、システムとその流路の不活性を実現するためにあらゆる妥当な手段を取る必要があります。注入口をメンテナンスした不活性度の高いシステム、ウール入りウルトライナートライナ、および Agilent ウルトライナート DB-35ms カラムも、対象化合物保護剤のグロノラクトンの添加による効果の実現に貢献しています。

ウール入りウルトライナートライナと DB-35 ms UI カラムを組み合わせて使用すると、4 種の P=O 有機リン系農薬で一貫性のある回収率とピーク形状を得るための優れたツールになることが実証されました。メタミドホス、アセフェート、オメトエート、およびジメトエートは分析が難しい農薬と見なされていますが、対象化合物保護剤の有無にかかわらず、ウール入りウルトライナートライナと DB-35ms UI カラムを使用してマトリクス注入を 100 回行った後でも一貫性の高い結果が生成されます。

参考文献

1. D. R. Erney, A. M. Gillespie, D. M. Gilvydis, C. F. Poole. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. Journal of Chromatography 1993; 638, 57-63
2. D. Smith and K. Lynam “Organonphosphorus Residues in Olive Oil by GC/FPD with Agilent J&W DB-35ms Ultra Inert” Agilent Technologies Inc. publication 5990-7722EN
3. Technical Overview “Agilent J&W Ultra Inert GC Columns: A New Tool to Battle Challenging Active Analytes” Agilent Technologies, Inc. publication number 5989-8665EN
4. K. Lynam, “Semivolatile Analysis Using an Inertness Performance Tested Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert Column” Agilent Technologies, Inc. publication 5989-8616EN
5. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 2003; 86, 412-431
6. M. Anastassiades, K. Mastovska, and S. J. Lehotay. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. Journal of Chromatography A. 2003; 1015, 163-184
7. C. K. Meng, Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush. Agilent Technologies, Inc. publication 5989-6018EN

詳細情報

これらのデータは標準的な結果を表しています。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan
June 2, 2011
5990-8235JAJP

Agilent Technologies